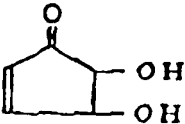




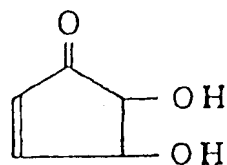
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 31/12, A23L 1/30, 2/52</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/43624</p> <p>(43) 国際公開日 1998年10月8日(08.10.98)</p>											
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01151</p> <p>(22) 国際出願日 1998年3月18日(18.03.98)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平9/92870</td> <td>1997年3月28日(28.03.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/111773</td> <td>1997年4月15日(15.04.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/157324</td> <td>1997年6月2日(02.06.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/163473</td> <td>1997年6月6日(06.06.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/283204</td> <td>1997年10月1日(01.10.97)</td> </tr> <tr> <td>特願平9/363281</td> <td>1997年12月16日(16.12.97)</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>務 華康(WU, Hua-Kang)(CA/JP)</p> <p>小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP)</p> <p>西山英治(NISHIYAMA, Eiji)(JP/JP)</p> <p>富永隆生(TOMINAGA, Takanari)(JP/JP)</p> <p>萩屋道雄(HAGIYA, Michio)(JP/JP)</p> <p>加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP)</p> <p>〒520-2193 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号</p> <p>資酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)</p>	特願平9/92870	1997年3月28日(28.03.97)	特願平9/111773	1997年4月15日(15.04.97)	特願平9/157324	1997年6月2日(02.06.97)	特願平9/163473	1997年6月6日(06.06.97)	特願平9/283204	1997年10月1日(01.10.97)	特願平9/363281	1997年12月16日(16.12.97)	<p>(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550-0001 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平9/92870	1997年3月28日(28.03.97)												
特願平9/111773	1997年4月15日(15.04.97)												
特願平9/157324	1997年6月2日(02.06.97)												
特願平9/163473	1997年6月6日(06.06.97)												
特願平9/283204	1997年10月1日(01.10.97)												
特願平9/363281	1997年12月16日(16.12.97)												
<p>(54)Title: DIABETES REMEDIES</p> <p>(54)発明の名称 糖尿病治療剤</p> <div style="text-align: center;">  <p>(I)</p> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>Therapeutic or preventive agents for diabetes characterized by containing as the active ingredient at least one compound selected from among 4,5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one of formula (I), optical isomers thereof, and salts of them.</p>													

(57)要約

下記式【I】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする糖尿病治療剤又は予防剤。



【I】

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コーゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン

FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE ジョージア
GH ガナ
GM ギニア
GN ギニア・ビサウ
GW ギニア・ビサウ
GR ギリシャ
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ

LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
ML マリ
MN モンゴル
MR モリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロベニア

SK スロヴァキア
SL シェン・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャド
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TM トルコ
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ベトナム
YU ユーゴスラヴィア
ZW ジンバブエ

明 細 書

糖 尿 病 治 療 剤

発明の属する技術分野

本発明は糖質代謝に作用する医薬及び糖質代謝の異常に起因する疾病の症状改善用又は疾病予防用食品又は飲料に関する。

従来技術

糖尿病は高血糖が引き起こす複合疾患であり、インスリン欠乏のためその補充を必要とするインスリン依存型糖尿病とインスリンが十分量生産されているにもかかわらず、受容体や糖輸送担体の異常などの理由で作用が発現されないインスリン非依存型糖尿病に大別される。

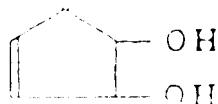
発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、血漿成分を正常化し、糖尿病等の疾患の治療又は予防に有効な化合物を開発し、該化合物を有効成分とする医薬、食品及び飲料を提供することにある。

課題を解決するための手段

本発明者らは上記目的を達成するために鋭意検討した結果、式【1】で表される化合物、4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン（以下、単にシクロペンテノンと称す）若しくはその光学活性体又はそれらの塩が前駆脂肪細胞、例えば線維芽細胞の脂肪細胞への分化誘導能、腫瘍壊死因子産生抑制能を有し、糖尿病の治療又は予防に有用であることを見出し、本発明を完成させた。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は下記式【1】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする糖尿病の治療剤又は予防剤に関する。



本発明の第2の発明は上記式【I】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその誘導体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有することを特徴とする糖尿病改善用食品飲料、又は糖尿病予防用食品飲料に関する。

図面の簡単な説明

図1はシクロペンテノン投与量と血糖値の関係を示す図である。

図2はシクロペンテノン投与量と血清インスリン値の関係を示す図である。

図3はシクロペンテノン投与量と血清トリグリセリド値の関係を示す図である。

図4はシクロペンテノン投与量と血清遊離脂肪酸値の関係を示す図である。

図5はシクロペンテノン濃度と腫瘍壊死因子産生量の関係を示す図である。

図6は(−)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(−)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

図7は(+)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(+)体シクロペンテノンの立体構造を示す図である。

発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において使用する式【I】で表されるシクロペンテノンは、4位と5位のヒドロキシル基の立体配置がシスの異性体とトランスの異性体の双方を包含する。本発明においてはシス体シクロペンテノンを用いてもよいし、トランス体シクロペンテノンを用いてもよいし、シス体シクロペンテノンとトランス体シクロペンテノンの混合物を用いてもよい。また、これらの光学活性体を用いてもよい。

シス体シクロペンテノンは化学合成法によって得られる〔ヘルベチカ キミカ アクタ (H e l v e t i c a C h i m i c a A c t a)、第55巻、第2838～2844頁(1972)〕。トランス体シクロペンテノンは化学合成法によっても得られるし〔カーボハイドレート リサーチ (C a r b o h y d r a t e R e s.)、第247巻、第217～222頁(1993)〕、またウロン酸、例えばグルクロン酸、ウロン酸誘導体、例えばグルクロノラクトン、又はこれらの含有物等を加熱処理することによっても得られる (P C T / J P 9 7 /

03052号明細書参照)。本発明ではシクロペンテノンを含むこれらの加熱処理物、その部分精製物及び精製物も使用できる。

例えば、ウロン酸としてD-グルクロン酸を使用し、その1%溶液を121℃で4時間加熱処理することにより、加熱処理物中にシクロペンテノンが生成される。この加熱処理物中のシクロペンテノンを溶媒で抽出し、抽出物を濃縮する。次にこの濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、溶出するシクロペンテノン画分を濃縮し、濃縮物からシクロペンテノンをクロロホルムで抽出し、抽出濃縮物の順相カラムクロマトグラフィーを行うことにより、加熱処理物中のシクロペンテノンが単離される。

シクロペンテノンの物性を下記に示す。なおシクロペンテノンの質量分析はDX302質量分析計(日本電子社製)を用いて行った。また、重クロロホルム溶媒を用いたNMRスペクトルの測定はJNM-A500(日本電子社製)を用いた。比旋光度はDIP-370型旋光計(日本分光社製)、UV吸収スペクトルはUV-2500分光光度計(島津製作所社製)、赤外吸収スペクトル(IR)はFTIR-8000赤外分光光度計(島津製作所社製)をそれぞれ用い測定した。

MS m/z 115 $[M+H]^+$

1H -NMR (CDCl₃)

δ 4.20 (1H, d, $J=2.4$ Hz, 5-H)、4.83 (1H, m, 4-H)、6.30 (1H, dd, $J=1.2, 6.1$ Hz, 2-H)、7.48 (1H, dd, $J=2.1, 6.1$ Hz, 3-H)

但し、 1H -NMRの化学シフト値はCHCl₃の化学シフト値を7.26 ppmとして表した。

旋光度: $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$ (c = 1.3, 水)

IR (KBr) ν_{max} 1712 cm⁻¹ (C=O)

0.25 cm⁻¹に吸収を有する。

100%

ヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン及び(+)-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オンを得ることができる。当然、合成方法により得られたシクロペンテノンも光学分割することができる。

例えば、シクロペンテノンをエタノールに溶かす。このエタノール溶液にヘキサン/エタノール (94/6) を更に加え、シクロペンテノン溶液を調製する。この試料溶液を、例えばキラルパック AS (ダイセル化学工業) カラムを用いカラム温度: 40℃、移動相: ヘキサン/エタノール (94/6) でHPLCを行うことにより、シクロペンテノンを光学分割することができる。

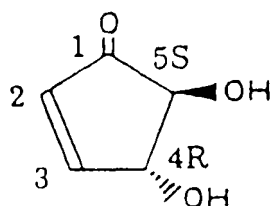
分割された(-)-トランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン〔以下、(-)体シクロペンテノンと称する〕の旋光度は $[\alpha]_D^{20} - 105^\circ$ (c 0.30、エタノール)であり、(+)-トランス-4, 5-ジヒドロキシ-2-シクロペンテン-1-オン〔以下、(+)-体シクロペンテノンと称する〕の旋光度は $[\alpha]_D^{20} + 104^\circ$ (c 0.53、エタノール)である。なお旋光度は前記のDIP-370型旋光計(日本分光社製)を用いて測定した。

次に(-)体シクロペンテノン及び(+)-体シクロペンテノンのそれぞれの質量分析、核磁気共鳴法(NMR)による構造解析、UV吸収スペクトルの測定、赤外吸収スペクトルの測定を上記記載の方法に準じ行う。その結果、両光学活性体は光学分割前のシクロペンテノンと同一の結果を示す。

光学分割された(-)体シクロペンテノン及び(+)-体シクロペンテノンをそれぞれp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体とし、J-720型円二色性分散計(日本分光社製)を用い、円二色性スペクトル(CD)を測定し、その結果をジベンゾエートキラリテイルールに適用し〔ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ(J. Am. Chem. Soc.)、第91巻、第3989~3991頁(1969)〕、その立体配置を決定した。

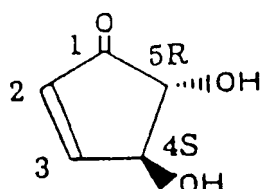
(-)体シクロペンテノンのp-ジメチルアミノベンゾイル誘導体のCD及び(-)体シクロペンテノンの立体構造を図6に示す。図中縦軸はモル円二色性、横軸は波長(nm)を示す。なお、上記立体構造を、式【II】として下記に示す

:



【II】

(+) 体シクロペンテノンの p-ジメチルアミノベンゾイル誘導体の CD 及び (+) 体シクロペンテノンの立体構造を図 7 に示す。図中縦軸はモル円二色性、横軸は波長 (nm) を示す。なお、上記立体構造を、式【III】として下記に示す：



【III】

図 6、7 及び式【II】、式【III】に示すように (−) 体シクロペンテノンは (−) − (4R, 5S) − トランス − 4, 5 − ジヒドロキシ − 2 − シクロペンテン − 1 − オン、 (+) 体シクロペンテノンは (+) − (4S, 5R) − トランス − 4, 5 − ジヒドロキシ − 2 − シクロペンテン − 1 − オンである。

以上、本発明に使用するシクロペンテノン又はその光学活性体はいかなる方法で製造しても良く、明細書で開示の方法で製造しても良く、化学合成方法で合成しても良く、シクロペンテノンのトランス体、シス体、それらの混合物及びそれらの光学活性体も本発明に使用される。

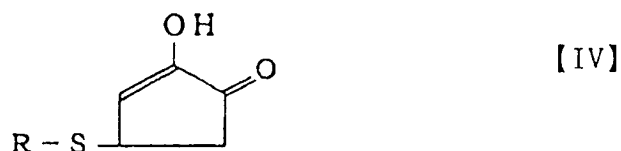
シクロペンテノン又はその光学活性体の塩としては、医薬として許容される塩があり、公知の方法にて変換することができる。

シクロペンテノン又はその光学活性体は、医薬として有効な代謝誘導体をも含む。ここで、この代謝誘導体は、シクロペンテノンを投与した場合においても得られる効果を示す。代謝誘導体は、シクロペンテノンの代謝物である。

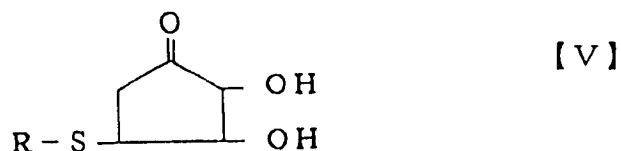
生成物は代謝有効物質の一つと推定される。

すなわちSH基含有化合物（R-SH）について例示すれば、シクロペンテノン
はSH基含有化合物と反応し、例えば下記一般式【IV】又は下記一般式【V】
で表される化合物となる。また一般式【V】で表される化合物は一般式【IV】で
表される化合物に変換される。

このようにシクロペンテノンはSH基含有化合物（R-SH）の存在下、各代
謝誘導体に変換され、生体中において生成されるこれらの代謝誘導体も医薬とし
ての効果を発揮する。



（但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である）。



（但し、RはSH基含有化合物からSH基を除いた残基である）。

したがってこれら生体内で形成される反応生成物、すなわち生体内での代謝誘
導体の形成を目的とするシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの
塩の使用も本発明に包含されるものである。

近年、糖尿病の病理研究結果より、正常な脂肪細胞は全身でのインスリン作用
が正常に行われるための重要な役割を果たし、糖代謝を円滑に進めるためには、
正常な脂肪細胞が必要とされる〔実験医学、第14巻、第61～68頁（199
6）〕。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は前駆脂肪細胞、例
えば線維芽前駆細胞の分化誘導能を有し、該細胞を脂肪細胞へ分化誘導する。そ
こで、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される

化合物を摂取することにより、正常な脂肪細胞が増加し、糖尿病の症状が改善されるものと推定される。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は血糖低下作用を有し、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とする糖尿病治療剤又は予防剤を作製することができる。

すなわち、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば糖尿病治療剤又は予防剤を製造することができる。当該製剤の製造は一般的には、シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニト、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし

に調製される。

本発明の糖尿病治療剤又は予防剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与経路は、例えば経口投与、経皮投与、経筋投与、経静脈投与、経眼投与、

注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

糖尿病治療剤又は予防剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有されるシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物の量が成人1日当り10 μ g \sim 200mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を糖尿病改善又は予防用飲食品の原料として用いても良い。シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩含有物を摂取することにより、糖尿病が改善され、尿糖量が激減する。また性機能低下等の合併症状も顕著に改善される。更に高脂血症が改善される。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は高脂血症改善作用、すなわち血清トータルコレステロール低下作用、血清トリグリセリド低下作用、血清遊離脂肪酸低下作用を有し、これらの作用を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば高脂血症治療剤又は高脂血症予防剤を製造することができる。当該製剤の製造は上記糖尿病治療剤又は予防剤に準じて行えば良く、また糖尿病治療剤又は予防剤に準じた方法で投与することができる。またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を高脂血症改善又は予防用飲食品の原料として用いても良い。シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩の含有物を摂取することにより、高脂血症が改善され、血中脂質量が激減する。

また前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導能を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組

また前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導能を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導剤を製造することができる。当該製剤の製造は上記糖尿病治療剤又は予防剤に準じて行えば良く、また糖尿病治療剤又は予防剤に準じた方法で投与することができる。

またシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩は腫瘍壊死因子産生抑制作用を示し、腫瘍壊死因子が原因となるインスリン非依存型糖尿病〔ネーチャー（Nature）、第389巻、第610～614頁（1997）〕の治療、予防に有用である。

シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分とする薬剤は前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導剤として、腫瘍壊死因子産生抑制剤として有用である。シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を投与することにより、血糖値の改善、インスリン値の正常化が認められ、本発明の薬剤は糖尿病の治療剤又は予防剤として用いることができる。更に、本発明の薬剤の投与により血漿中のトリグリセリド、遊離脂肪酸値も正常化し、本発明の薬剤は高脂血症治療用又は予防用薬剤として使用できる。

更にシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩を有効成分とする前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導剤は、生化学研究等に有用な分化誘導剤であり、該分化誘導剤を使用することにより、生化学研究等に有用な前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導方法を提供でき、該方法を使用することにより、分化誘導の阻害剤や分化誘導剤のスクリーニングを行うことができる。

本発明においてはシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩、シクロペンテノンを含有する加熱処理物、及び該加熱処理物からの部分精製シク

誘導用食品又は飲料を提供することができる。

明の食品又は飲料に包含される。

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に糖尿病改善作用又は予防作用等を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物が有効成分として含有されていれば良い。

本発明の食品又は飲料としては、糖尿病改善作用又は予防作用等を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

なお、本発明で使用する化合物はその生理活性の有効量の投与を行っても毒性は認められず、例えば経口投与の場合シクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩のいずれかを100mg/kgでラットに単回投与しても死亡例は認められない。

実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

参考例1

10gのD-グルクロン酸（シグマ社製 G 5269）を1リットルの水に溶解し、121℃で4時間加熱した後約10mlになるまで減圧下濃縮した。これに酢酸ブチル：酢酸：水＝3：2：2混合液の上層40mlを加えて混合後、遠心によって得た上清を減圧下約10mlまで濃縮した。

上記抽出液をカラムクロマトグラフィー用シリカゲルBW-300SP（2×28cm、富士シリシア化学社製）にアプライし、酢酸ブチル：酢酸：水＝3：2：2の上層を溶離液としてコンプレッサーで0.2kg/cm²に加圧し、毎分5mlの流速で分離を行った。1画分当り10mlになるようにフラクショネ

ーションを行い、各画分の一部をとって薄層クロマトグラフィーで分析したところ61番から80番までの画分に高純度のシクロペンテノンが含まれていた。これらの画分を集めて減圧下濃縮した後40mlのクロロホルムで抽出し、抽出液を減圧下濃縮することによって100mgのシクロペンテノンを得た。

この画分をパルパックタイプSカラム（宝酒造社製）を用いた順相HPLCで分離し、215nmの紫外線吸収で検出したところ、純度は98%であった。

上記シクロペンテノン113.9mgをエタノール2.85mlに溶かした。このエタノール溶液にヘキサン/エタノール（94/6）3.85mlを更に加え、17mg/mlのシクロペンテノン溶液を調製した。この液を0.5 μ mのフィルターでろ過し、光学分割HPLC試料溶液とした。

この試料溶液を以下の条件で光学分割HPLCを行い、前ピークの（-）体シクロペンテノン及び後ピークの（+）体シクロペンテノンのフラクションをそれぞれ集め、減圧乾固し、（-）体シクロペンテノン43.2mg、（+）体シクロペンテノン43.0mgをそれぞれ得た。

光学分割 HPLC 条件

カラム：キラルパック AS（ダイセル化学工業）2.0cm×25.0cm

カラム温度：40℃

移動相：ヘキサン/エタノール（94/6）

流速：14.0 ml/min

検出：UV 210 nm

試料注入量：150 μ l（2.55 mg）

得られた（-）体シクロペンテノン及び（+）体シクロペンテノンは両者共に約1%のエナンチオマーを含有していたため再度上記の条件で光学分割した。その結果、前ピークの（-）体シクロペンテノン30.0mgから19.7mgのエナンチ

オマーを含有する（-）体シクロペンテノンと含有しない（-）体シクロペンテノンをそれぞれ得た。なお（-）体シクロペンテノンは、（+）体シクロペンテノンの光学分割と同様の条件で光学分割した。

（-）体シクロペンテノンの光学分割は、（+）体シクロペンテノンの光学分割と同様の条件で行った。

実施例 1

ウシ胎児血清 (FCS) を 5% 含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で胎児マウス由来線維芽前駆細胞 3T3-L1 細胞 (ATCC CL-173) を 90% コンフルエントになるまで培養した。一方、FCS を分画分子量 3 万の限外ろ過膜で限外ろ過して得られた高分子量画分をプロテイナーゼ K、プロナーゼ、及びロイシンアミノペプチダーゼ処理したもの (酵素処理 FCS と呼ぶ) 5% を含有する DMEM に 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、又は $10^{-9} \mu\text{g/ml}$ の参考例 1 記載の方法で調製したシクロペンテノンあるいは 100、50、10、5、1、又は $0.2 \mu\text{g/ml}$ のインスリン (宝酒造社販売) を添加して 9 日間培養した。なお、培養 3 日後と 6 日後にそれぞれの濃度のシクロペンテノン又はインスリンを含む新鮮な培地に交換した。培地細胞中に含まれる脂肪をオイルレッド O (シグマ社製) で染色して顕微鏡観察した。細胞が脂肪細胞に分化して脂肪が蓄積すると赤色に染色される。

その結果を表 1 に示す。なお、表 1 において - は脂肪の蓄積が見られないものを、± は脂肪の蓄積が 25% 未満の細胞に見られるものを、+ は脂肪の蓄積が 25% 以上 50% 未満の細胞に見られるものを、++ は脂肪の蓄積が 50% 以上 75% 未満の細胞に見られるものを、+++ は脂肪の蓄積が 75% 以上の細胞に見られるものを示す。

表 1

シクロペンテノン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	脂肪蓄積の度合い
10^{-1}	±
10^{-2}	+
10^{-3}	++
10^{-4}	++
10^{-5}	+++
10^{-6}	+++
10^{-7}	++
10^{-8}	±
10^{-9}	—
0	—
インスリン ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	脂肪蓄積の度合い
100	++
50	+++
10	+++
5	++
1	+
0.2	+
0	—

表1に示すように、 10^{-1} ～ $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のインスリンを添加したとき、脂肪蓄積の度合いは++～+++であった。

ペンテノンを追加したときに脂肪蓄積の度合いが+++になった。シクロペンテノンは低濃度で脂肪細胞への分化誘導活性を示した。

また（－）体シクロペンテノン、（＋）体シクロペンテノンについても同様の結果を得た。

実施例 2

（1）インスリン非依存型糖尿病自然発症マウスのKK-A^y マウス（オス、10週令、体重約40g）は日本クレア社より購入した。CE-2（日本クレア社）を餌として与え、約1週間の単独予備飼育後、11週令で試験に使用した。1群8～9匹のマウスに、参考例1記載の方法で調製したシクロペンテノンをkg体重当り0.1mg、1mg、10mgをそれぞれ1日1回、4日目まで計5回連日強制経口投与し、4日目に眼底静脈より採血した。対照群にはシクロペンテノンの代りに水を与え、マウスから同様に採血し、血漿分離後、グルコース測定試薬（GLUネオ シノテスト；シノテスト社）で血漿中のグルコース量を測定した。

その結果を表2に示す。血漿中の血糖量はシクロペンテノン投与群で対照群に比べ濃度依存的に降下作用が認められ、特に10mg/kg/日、5回投与群の血漿中の血糖値は対照群のそれに比べ、血糖量の降下作用が認められた。なお、シクロペンテノン投与群と対照群において体重増減の差は認められなかった。

表 2

シクロペンテノン 投与量 (mg/kg/日)	匹数	血漿-グルコース (mg/dl) (4日目採血)
- (対照群)	9	432.3 ± 45.4
0.1	8	411.9 ± 44.0
1	9	327.9 ± 25.4
10	9	269.8 ± 28.5

(2) KK-A^y マウス (オス、4週令) を日本クレア社より購入し、10週令まで飼育後、参考例1記載の方法で調製したシクロペンテノンを14日間経口投与して、血糖、血中インスリン及び脂質に及ぼす影響を検討した。シクロペンテノンは13mg/kgの用量を用いた。血糖値は13mg/kgのシクロペンテノン投与群で低下した (図1)。血清インスリン値は13mg/kgのシクロペンテノン投与群で低下した (図2)。血清脂質に対して、トリグリセリド値は13mg/kgのシクロペンテノン投与群で低下し (図3)、遊離脂肪酸は13mg/kgのシクロペンテノン投与群で低下した (図4)。

すなわち図1はシクロペンテノン投与量と血糖値の関係を示す図であり、図中縦軸は血清グルコース値 (mg/dl)、横軸はシクロペンテノン投与量 (mg/kg) を示す。図2はシクロペンテノン投与量と血清インスリン値の関係を示す図であり、図中縦軸は血清インスリン値 (μ U/ml)、横軸はシクロペンテ

ノンの投与量 (mg/kg) を示す。図3はシクロペンテノンの投与量とトリグリセリド値の関係を示す図であり、図中縦軸はトリグリセリド値 (mg/dl) を示す。図4はシクロペンテノンの投与量と遊離脂肪酸値の関係を示す図であり、図中縦軸は遊離脂肪酸値 (mg/dl) を示す。

1)、横軸はシクロペンテノン投与量 (mg/kg) を示す。図4はシクロペンテノンの投与量と遊離脂肪酸値の関係を示す図であり、図中縦軸は遊離脂肪酸値 (mg/dl) を示す。

脂肪酸値 ($\mu\text{Eq}/\text{リットル}$)、横軸はシクロペンテノン投与量 (mg/kg) を示す。なお図中* はダンネット マルチプル 比較試験により、シクロペンテノン無投与群に対する有意差 $p < 0.05$ を、**は $p < 0.01$ を意味する。

なお、動物は生理食塩水 ($5\text{ml}/\text{kg}$)、シクロペンテノンの $13\text{mg}/5\text{ml}/\text{kg}$ の2群構成で、各群10例とした。各試験物質は1日1回14日間経口投与し、最終投与日に、試験物質投与4時間後にエーテル麻酔し、下腹部大静脈より採血した。

血清インスリンは、酵素-免疫法 (市販キット: グライザムインスリン-EIATEST、和光純薬社製) にて測定した。血清中の糖、トリグリセリド及び遊離脂肪酸は、それぞれヘキソキナーゼ-G6PDH法、GPO・DAOS法及びACS・ACOD法で自動分析装置 (7070形: 日立製作所製) を用い測定した。

以上の結果よりシクロペンテノンに血糖、インスリン及び脂質低下効果が確認された。

また (-) 体シクロペンテノン、(+) 体シクロペンテノンについても同様の結果を得た。

実施例 3

(1) 20週令の雌性CDF1系マウスに生理食塩水に溶解したサルモネラ アボータス イークウィー (*Salmonella abortus equi*) 由来のLPS (リポポリサッカライド: シグマ社製) を腹腔内投与 ($0.1\text{mg}/\text{kg}$) し、エンドトキシンショックモデルを作製した。

シクロペンテノンはLPS投与の30分前に $30\text{mg}/\text{kg}$ の用量で腹腔内投与あるいは経口投与した。一方、対照群は無処置とした。LPS投与90分後にマウスより血液を採取し、血清を分離した。次に血清中の腫瘍壊死因子量をTNF- α ・ELISAキット (ジェンザイム社製) にて測定し、シクロペンテノン投与による腫瘍壊死因子産生抑制効果を測定した。

その結果を表3に示す。すなわち、対照群に対し、シクロペンテノン投与群では腹腔内投与群、経口投与群のいずれの群においても、血清中の腫瘍壊死因子の

濃度は低値であり、シクロペンテノン投与により、腫瘍壊死因子の産生が有意に抑制されていた。

表 3

群	匹数	血清中 TNF- α (ng/ml) 平均 \pm SE
対照群	5	3.96 \pm 0.52
シクロペンテノン腹腔内投与群	5	0.58 \pm 0.08*
シクロペンテノン経口投与群	5	1.80 \pm 0.30*

** $p < 0.001$ で対照群に対し有意

* $p < 0.01$ で対照群に対し有意

(2) 8週齢の雌性CDF1系マウスを用いLPSを腹腔内投与(10 μ g/マウス)し、エンドトキシンショックモデルを作製した。シクロペンテノンはLPS投与の15分前に、0.03、0.3、3、30mg/kgの用量で皮下投与した(一群4匹)。LPS投与1時間後にマウスより採血し、血清を分離し、血清中腫瘍壊死因子- α 量を市販のELISAキット(エンドジェン社製)にて測定した。その結果を表4に示す。すなわち、LPS投与による血清中の腫瘍壊死因子- α 濃度の上昇を、シクロペンテノンは用量依存的に抑制した。

表 4

	投与量 mg / kg	腫瘍壊死因子量 (ng / ml) 平均 ± SD
対照群		3.00 ± 0.30
シクロ	30	0.24 ± 0.08
ペンテ	3	1.41 ± 0.45
ノン投	0.3	2.30 ± 0.24
与群	0.03	2.68 ± 0.28

(3) 8週齢の雌性CDF1系マウスの腹腔内にパラフィンオイル（コスモバイオ社）2mlを投与し、腹腔マクロファージ（Mφ）を誘導した。パラフィンオイル投与1週間後にマウスの腹腔内にRPMI-1640 培地（ギブコ社）4mlを注入しよくマッサージした後回収し、腹腔細胞を得た。

腹腔細胞はRPMI-1640 培地で2回洗浄した後、10%牛胎児血清（FCS：ハイクローン社）を含んだRPMI-1640 培地に懸濁し、細胞濃度を 1×10^6 cells/mlに調整した。調整した細胞液1mlを24穴プレートに播取し、37℃ CO₂インキュベーターで2時間培養した。培養後上清に含まれる非接着細胞を除去し、接着細胞を腹腔Mφとして用いた。

プレートの各穴に10%FCSを含んだRPMI-1640 培地800μlを加え、次いで生理食塩水（大塚製薬社製）に溶解した1、10、100、1000μMのシクロペンテノン（シグマ社製）を100μl添加し、37℃ CO₂インキュベーターで1時間培養した。

培養後100ng/mlのリポポリサッカライド（シグマ社製）を100μl

添加し、更に24時間培養した。培養終了後、培養上清を回収し産生された腫瘍壊死因子 α 量を市販のELISAキット（エンドジェン社製）を用いて定量した。

その結果を図5に示す。すなわち図5はシクロペンテノン濃度と腫瘍壊死因子産生量の関係を示す図であり、縦軸は腫瘍壊死因子量（pg/ml）、横軸は各試料のシクロペンテノン濃度（ μ M）を示す。

シクロペンテノンは10 μ M以上の濃度においてリポポリサッカライドが誘発するマウス腹腔マクロファージからの腫瘍壊死因子産生を著明に抑制した。

以上、シクロペンテノンは腫瘍壊死因子産生抑制作用を示した。また（－）体シクロペンテノン、（＋）体シクロペンテノンについても同様の結果を得た。

実施例4

5年前にインスリン非依存型糖尿病と診断され、治療薬としてオイグルコン（山之内製薬社販売）を1日1錠服用し、糖尿病の治療を受けてきたが、マイルス三共社製の尿糖試験紙を用いて測定した尿糖は空腹時で（+++）と糖尿病の改善が見られなかった男性（55才）が、後記実施例7－（2）で得られた飲料を毎日50ml（シクロペンテノン2mg含有）、3カ月飲用した結果、空腹時の尿糖の測定で（－）となり、顕著なインスリン非依存型糖尿病の治癒が認められた。またインスリン非依存型糖尿病の治癒と共に、性機能の顕著な回復が認められた。

実施例5

注射剤

（1）生理食塩液（日本薬局方収載品）にシクロペンテノンを1%濃度で加え注射剤を作製した。

（2）生理食塩水（前記と同じ）に（－）体シクロペンテノン及びグリシルリ

（3）シクロペンテノン

錠剤

錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

(2) (+) 体シクロペンテノン 0.1 mg、グリシルリチン酸ジカリウム 10 mg 及び微結晶セルロースの適量を含む錠剤を調製し、糖衣を施し、錠剤を作製した。

実施例 7

(1) ペクチン (ポモシンペクチン LM-13CG: ハーキュリーズ社製) 5 kg を水道水 100 リットルに添加し、液温 28℃ から液温 120℃ となるまで水蒸気吹込みにより 35 分間昇温させ、次いでかくはん下で 120℃、5 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 135 リットルを調製した。次いで冷却物にろ過助剤として、セライト #545 (セライト社製) 1.35 kg、及びシリカ #600-S (中央シリカ社製) 1.35 kg を添加し、次いでセライト #545 の 0.1 kg、及びシリカ #600-S の 0.1 kg でプレコートしたコンパクトフィルター (6 インチ 16 段ろ紙: ADVANTEC #327) でろ過を行った。得られたろ液はプレートヒーター (日阪製作所製) による連続瞬間加熱処理 (98℃、60 秒) を行った後冷却し、150 リットルのシクロペンテノン含有のペクチン加熱処理液を調製した。

シクロペンテノン含有のペクチン加熱処理液の pH は約 3.5、酸度は 6.2 ml、糖度は 5.8 Brix % であった。なお pH は pH メーターで測定し、酸度は試料 10 ml を pH 7.0 に中和するのに要する 0.1 N NaOH 量 (ml) で表示した。更に糖度はブリックス糖度計で測定した。

(2) 下記組成で飲料を調製した。

果糖ブドウ糖液糖	5.00%
砂糖	4.00%
酸味料	1.20%
香料	0.30%
シクロペンテノン含有物	0.5%
精製水	残
計	100.00%

なおシクロペンテノン含有物としては実施例 7 - (1) 記載のシクロペンテノン含有ペクチン加熱処理液を使用し、その固形物換算量を添加した。この飲料 100 ml 中には 4 mg のシクロペンテノンが含有されている。

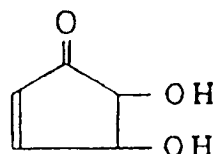
発明の効果

本発明により前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用を有し、糖尿病特にインスリン非依存型糖尿病の治療、改善又は予防作用を有する医薬が提供される。また高脂血症の治療、予防に有用な医薬が提供される。

また本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有するシクロペンテノン若しくはその光学活性体又はそれらの塩の適量を含むことが可能となった。これらの化合物が有する前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化誘導作用、腫瘍壊死因子産生抑制作用により、本発明の食品又は飲料は糖尿病、特にインスリン非依存型糖尿病改善用又は予防用、高脂血症の症状改善用又は予防用食品又は飲料として有用であり、糖尿病に伴う合併症、緑内障、性機能低下、高脂血症等の症状の改善又は予防にも極めて有用である。

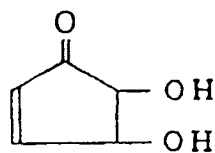
請 求 の 範 囲

1. 下記式【I】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を有効成分として含有することを特徴とする糖尿病治療剤又は予防剤。



【I】

2. 下記式【I】で表される4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン若しくはその光学活性体又はそれらの塩から選択される少なくとも1以上の化合物を含有することを特徴とする糖尿病改善用食品又は飲料、又は糖尿病予防用食品又は飲料。



【I】

図 2

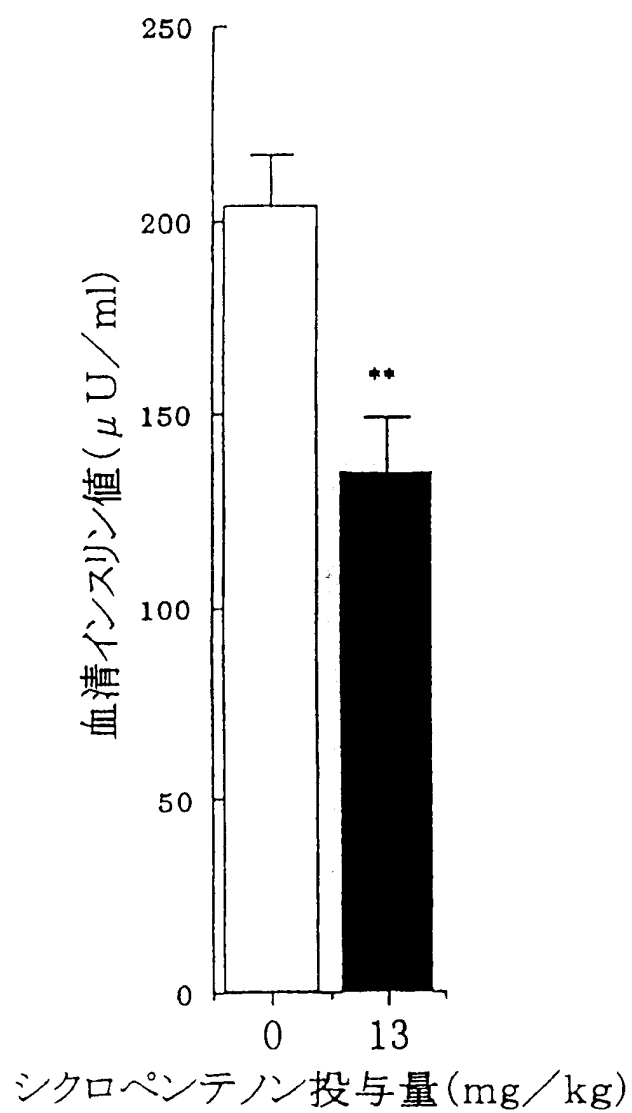


図 3

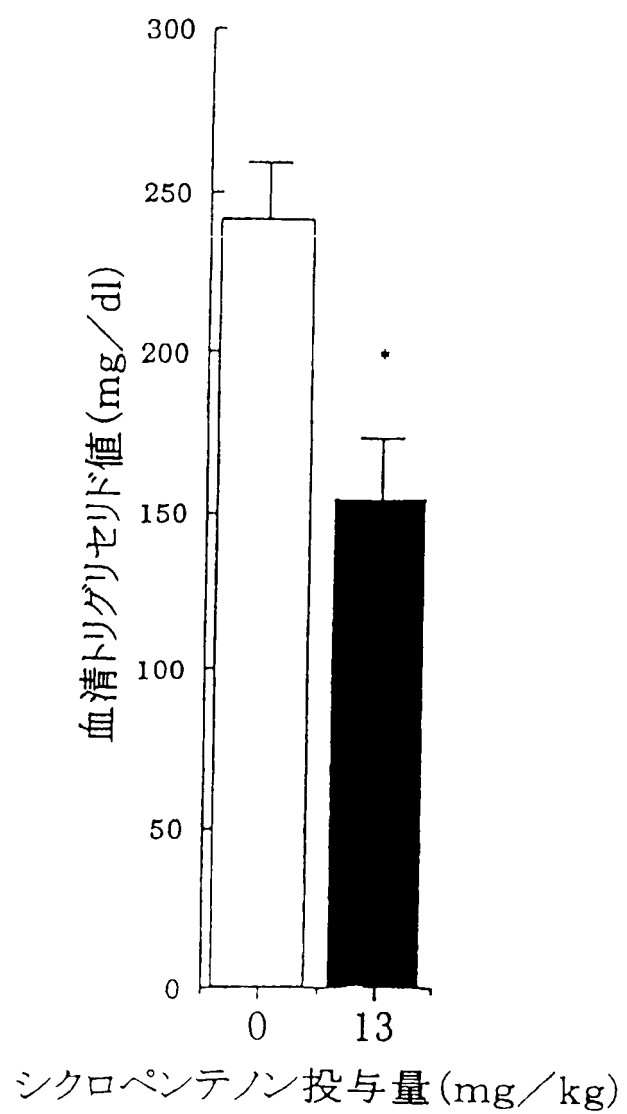


図 4

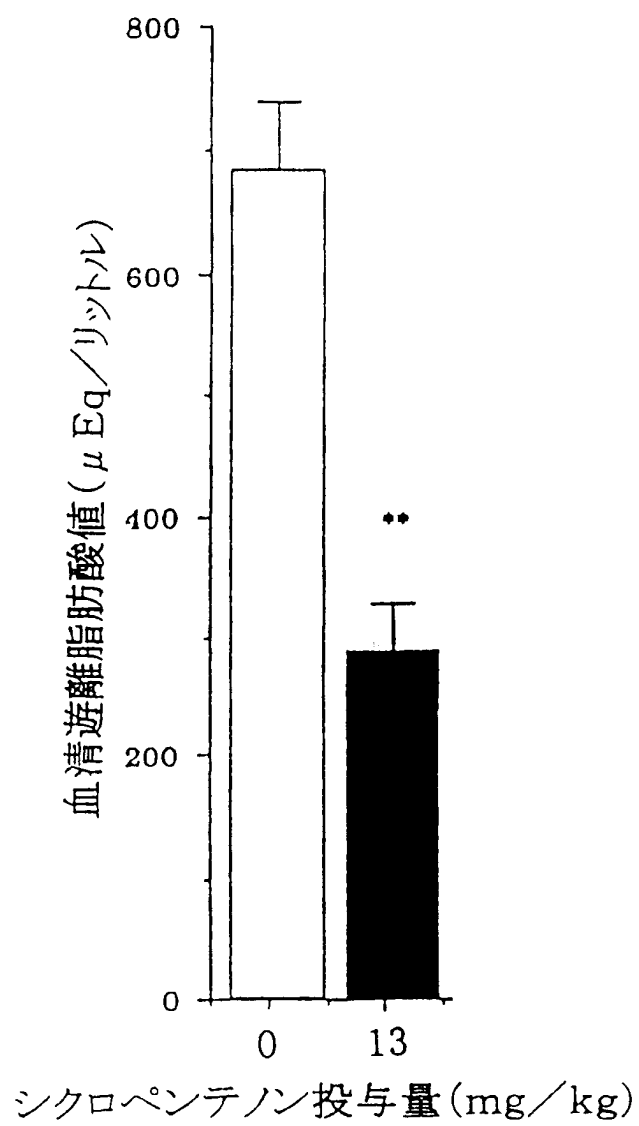


図 5

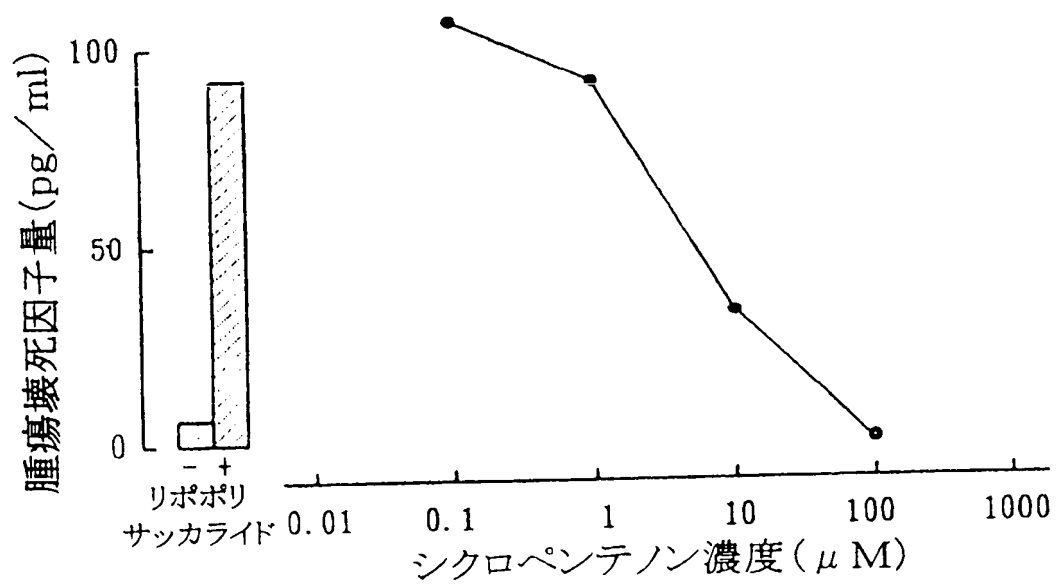


図 6

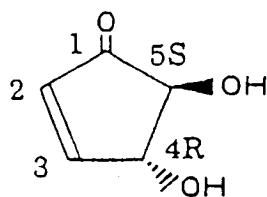
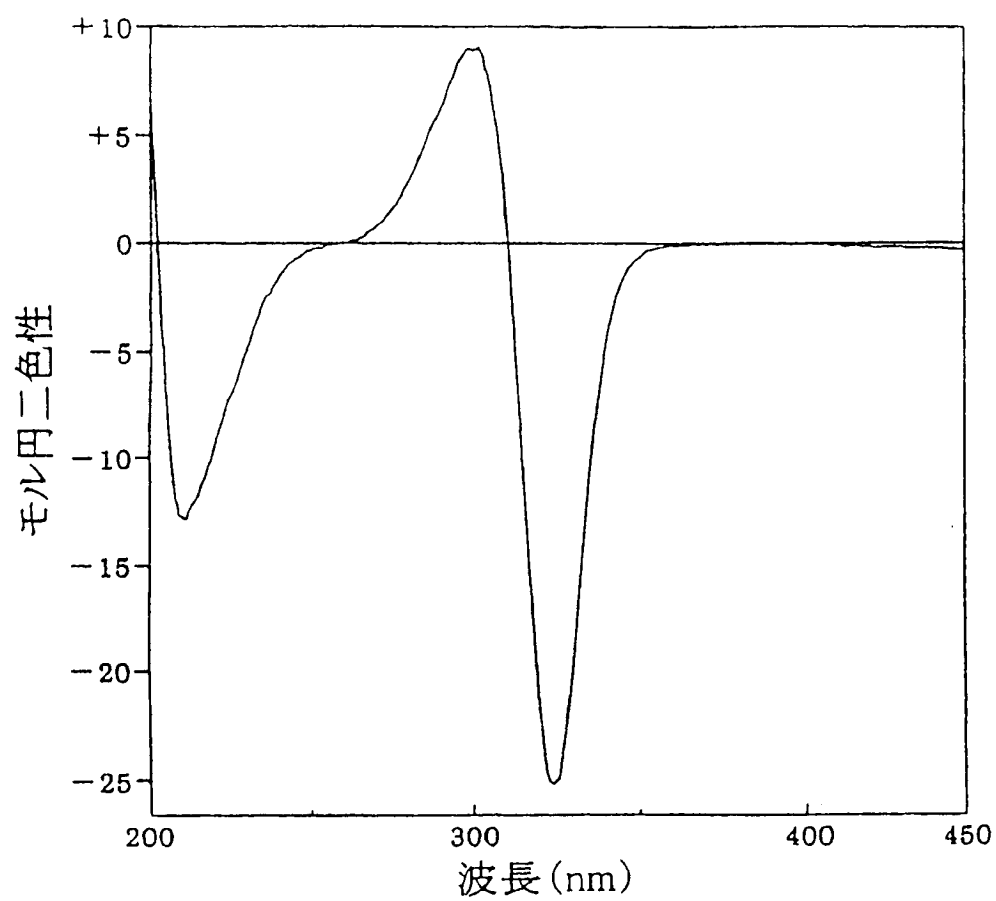
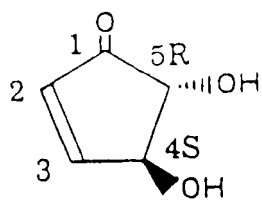
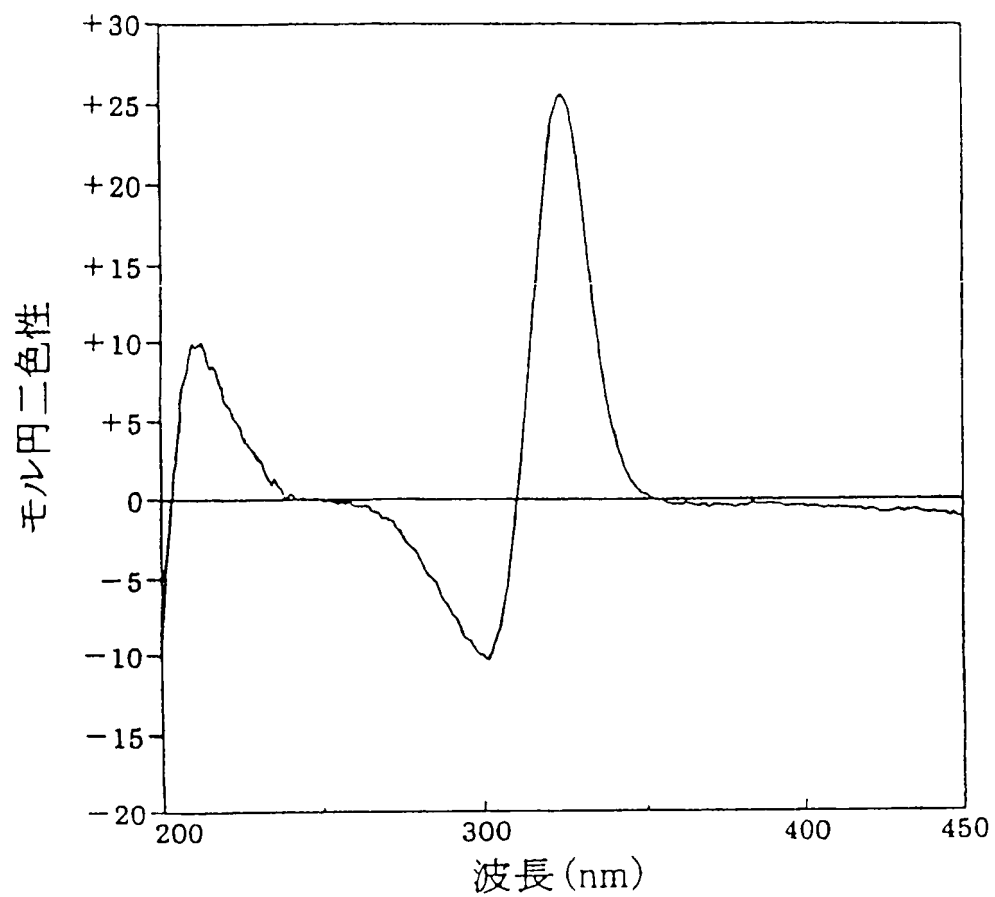


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, A	WO, 98/13328, A1 (Takara Shyuzo Co., Ltd.), April 2, 1998 (02. 04. 98) (Family: none)	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 15, 1998 (15. 05. 98)

Date of mailing of the international search report

May 26, 1998 (26. 05. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K31/12, A23L1/30, A23L2/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
E, A	WO, 98/13328, A1 (Takara Shyuzo Co., Ltd.) 2. 4月. 1998 (02. 04. 98) (ファミリーなし)	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

国際調査報告の発着日

〒100-8915
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番5号

電話番号 (03) 3581-1111 FAX 3581-3454

the first of these is the fact that the
the second is the fact that the
the third is the fact that the
the fourth is the fact that the
the fifth is the fact that the
the sixth is the fact that the
the seventh is the fact that the
the eighth is the fact that the
the ninth is the fact that the
the tenth is the fact that the
the eleventh is the fact that the
the twelfth is the fact that the
the thirteenth is the fact that the
the fourteenth is the fact that the
the fifteenth is the fact that the
the sixteenth is the fact that the
the seventeenth is the fact that the
the eighteenth is the fact that the
the nineteenth is the fact that the
the twentieth is the fact that the
the twenty-first is the fact that the
the twenty-second is the fact that the
the twenty-third is the fact that the
the twenty-fourth is the fact that the
the twenty-fifth is the fact that the
the twenty-sixth is the fact that the
the twenty-seventh is the fact that the
the twenty-eighth is the fact that the
the twenty-ninth is the fact that the
the thirtieth is the fact that the
the thirty-first is the fact that the
the thirty-second is the fact that the
the thirty-third is the fact that the
the thirty-fourth is the fact that the
the thirty-fifth is the fact that the
the thirty-sixth is the fact that the
the thirty-seventh is the fact that the
the thirty-eighth is the fact that the
the thirty-ninth is the fact that the
the fortieth is the fact that the
the forty-first is the fact that the
the forty-second is the fact that the
the forty-third is the fact that the
the forty-fourth is the fact that the
the forty-fifth is the fact that the
the forty-sixth is the fact that the
the forty-seventh is the fact that the
the forty-eighth is the fact that the
the forty-ninth is the fact that the
the fiftieth is the fact that the
the fifty-first is the fact that the
the fifty-second is the fact that the
the fifty-third is the fact that the
the fifty-fourth is the fact that the
the fifty-fifth is the fact that the
the fifty-sixth is the fact that the
the fifty-seventh is the fact that the
the fifty-eighth is the fact that the
the fifty-ninth is the fact that the
the sixtieth is the fact that the
the sixty-first is the fact that the
the sixty-second is the fact that the
the sixty-third is the fact that the
the sixty-fourth is the fact that the
the sixty-fifth is the fact that the
the sixty-sixth is the fact that the
the sixty-seventh is the fact that the
the sixty-eighth is the fact that the
the sixty-ninth is the fact that the
the seventieth is the fact that the
the seventy-first is the fact that the
the seventy-second is the fact that the
the seventy-third is the fact that the
the seventy-fourth is the fact that the
the seventy-fifth is the fact that the
the seventy-sixth is the fact that the
the seventy-seventh is the fact that the
the seventy-eighth is the fact that the
the seventy-ninth is the fact that the
the eightieth is the fact that the
the eighty-first is the fact that the
the eighty-second is the fact that the
the eighty-third is the fact that the
the eighty-fourth is the fact that the
the eighty-fifth is the fact that the
the eighty-sixth is the fact that the
the eighty-seventh is the fact that the
the eighty-eighth is the fact that the
the eighty-ninth is the fact that the
the ninetieth is the fact that the
the ninety-first is the fact that the
the ninety-second is the fact that the
the ninety-third is the fact that the
the ninety-fourth is the fact that the
the ninety-fifth is the fact that the
the ninety-sixth is the fact that the
the ninety-seventh is the fact that the
the ninety-eighth is the fact that the
the ninety-ninth is the fact that the
the hundredth is the fact that the